

セルファイン MAX イオン交換クロマトグラフィー充填剤の

カラム充填方法

セルファイン MAX イオン交換クロマトグラフィー充填剤はセルファインの次世代のクロマトグラフィー充填剤である。真球状のセルロース粒子に新しい架橋方法を用いているため、物理的強度が高い特長を持つ。このため高流速でのクロマトグラフィー操作が可能である。セルファイン MAX イオン交換クロマトグラフィーのラインナップには MAX S-h、MAX S-r、MAX Q-h、MAX Q-r、MAX DEAE、MAX CM がある。これらの充填剤はベース担体にデキストランを修飾した後にイオン交換リガンドを付加している。セルファイン MAX GS は陽イオン交換リガンドをグラフトポリマーで修飾した充填剤である。これらのイオン交換クロマトグラフィー充填剤は、例えばプロテインA 担体後の dsDNA などのポリッシング精製に使用できる。またセルファイン MAX イオン交換クロマトグラフィー充填剤は物理的強度が高く、化学的に安定的なセルロース粒子を使用しているため、少量ラボスケールから大型カラムを使用した製造スケールまで幅広く使用することができる。

フローパッキングの手順（直径 30 cm カラムまで）

- 1) カラム体積 < 1 L の場合：必要量の充填剤スラリーをガラスフィルターでろ過して、5 倍容量の純水で 3 回洗浄する。この操作で保存液を除去する。洗浄は必要に応じてバッファーを用いても良い。
- 2) カラム体積 > 1 L の場合：製品ボトルを静置することで充填剤を十分に沈降させた後、保存液をデカンテーションで取り除く。その後、純水を加えてスラリー状に懸濁させる。再び静置させて充填剤を十分に沈降させた後、上清を取り除く。この操作を 2~3 回繰り返して保存液を置換する。同時にカラムの流路も洗浄しておく。
- 3) 最後の洗浄が完了したら、50~60% のスラリーになるようにパッキング用のバッファーを加えて懸濁する。
- 4) 自然沈降体積を測定するために、スラリーの一部を 50mL メスシリンダーに入れて、

4 時間以上または終夜で静置する。自然沈降体積を測定して正確なスラリー濃度を計算する。計算式は以下の通り。

スラリー濃度% = 自然沈降カラム体積 / 全体積
 5) スラリー濃度が 50% になるようにパッキング用バッファー量を調節する。

6) カラムに充填する 50% スラリー量は以下の計算式で算出できる。

$$50\% \text{スラリー量} = (\text{目標カラム体積} \times 2) \times (Cf)$$

Cf はコンプレッションファクターで、以下の式で導かれる。

$$Cf = \text{自然落下沈降体積} / \text{パッキング体積}$$

例えば、100mL のカラム体積に充填する場合、Cf が 1.15 で最適なパッキング結果が得られる場合、必要なスラリー量は以下の通り計算できる。

$$(100 \times 2) \times 1.15 = 230 \text{ mL}$$

7) 下部アダプターを所定の位置に取り付ける。カラム底部を開けた後、バッファーを

カラムに加えながら、下部フィルターに残存している空気をシリンジやポンプで除く。空気が入らないようにバッファはカラム底部から 1cm 程度は残して置くと良い。

8) 必要に応じて、リザーバーをカラムの上部に設置した後、スラリーの全量をカラムに加える。

Note: 均一な充填を達成するために、スラリーは一気にカラムに加えること。

9) カラム底部のエンドフィッティングを閉める。

10) 空気がゲル内に入り込まないように注意しながらスラリーを一気にカラム内に注ぎ込む。

11) カラム底部のエンドフィッティングを開けてゲルを沈降させる。ゲルが沈降すると、充填用バッファよりもゲルの方が早く沈降するため液面が透明になる。2~3 cm までバッファが透明になったらカラム底部のエンドフィッティングを閉じる。

12) 注意深くバッファをカラム上部まで満たす。このとき沈降しているゲルが浮き上がらないようにする。

13) 上部アダプターの準備をする。シリンジなどを利用して上部アダプターの流路に存在するすべての空気を除去して充填用バッファで満たしておく。

14) パッキングバッファを 200 cm/h で 30~60 分通液して充填剤を圧縮していく。

Note: この段階ではカラムの背圧*が 0.25~0.30 MPa になるように流速を調節すること。この流速は安定的なカラムパッキングを保

証するために、充填後の操作流速よりも高流速である必要がある。

*この圧力は充填剤を含むカラムシステム全体の圧力である。充填剤にかかる圧力を確認するには、事前に充填剤を加えない条件でカラムを組み立てて背圧を確認しておくが良い。圧力損失はカラム入口側の圧力計で測定すること。

16) ゲルの高さが安定した後、通液を止める。次いで流入口を閉じる。その後カラム上部アダプターから充填用バッファが流れるように流路を変更する(上部アダプターは外さないこと)。ゆっくりと上部アダプターを下げていくと空気と充填用バッファがあふれてくるようになる。上部アダプターを充填剤の表面の位置まで下げていく。

17) 充填用バッファがカラムに通液できるようにした後、カラム底部のエンドフィッティングを開けて流速 30~800cm/h で通液する。上部アダプターよりもベッドが縮む場合、上部アダプターを下げて調節する。

18) 最終的なカラム高さからカラム体積を計算する。計画していたカラム体積より多い場合、上部アダプターを下げて調節していく。カラム体積は目標とするカラム体積に近づけるべきである。一方で計画していたカラム体積よりも低い場合、カラムに投入する前に調製したスラリー濃度が薄いか、ゲルが圧縮されすぎてコンプレッションファクターが計算よりも高くなっている可能性がある。

19) カラムパッキングを評価するために、HETP およびアシンメトリー (As) を求める。カラム体積の 1% 液量の 2% アセトン (純水に溶解) または 1M 塩化ナトリウムを 150 cm/h の流速でカラムに通液する。

ピーク形状から HETP とアシンメトリー (As) を算出して評価する。As が 0.8~1.4 かつ還元理論段数 RPH が 2~3 であれば問題ない。

20) カラム充填後にカラムを通液してコンディショニングすることができる。例えば上部入口から 0.25~0.30 MPa の操作圧力で、30~60 分通液した後、逆に出口側から同様に通液する。この操作によってより均一な充填が可能となる。

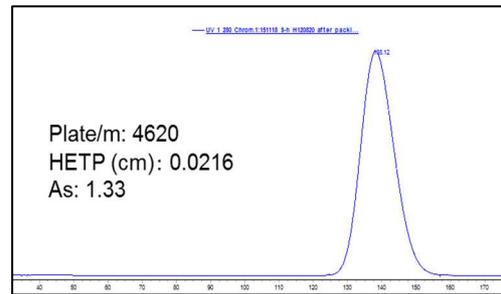
また逆洗浄は定置洗浄にも使用できる。カラム上部フィルターに不純物が堆積した場合に逆洗浄することで効果的に定置洗浄ができる。この操作は 5~10 サイクルの使用後に使用することを推奨する。

内径 3.2 cm カラムでのセルファイン MAX S-h の充填事例

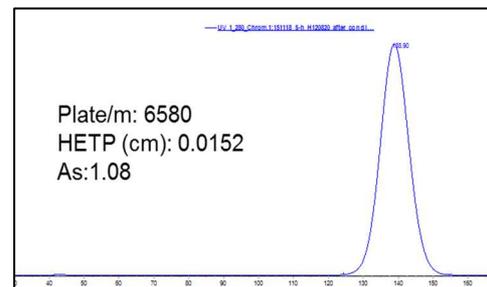
- カラム: EMD Millipore Vantage Column
内径 3.2 cm
- カラム高さ: 19.8 cm
- 充填バッファー: 純水
- 充填方法: 50%スラリー液を 0.25~0.30 MPa の圧力で充填
- カラムコンディショニング: カラム上部から 0.3MPa で 30 分通液した後、同様にカラム出口から通液
- コンプレッションファクター: 1.20

カラムコンディショニングの効果を確認した結果を図 1 に示す。

図 1 カラムコンディショニングの効果
パネル A: コンディショニング前



パネル B: コンディショニング後



カラムコンディショニング後に、理論段数 (Plate/m) は極めて向上した。またピーク非対称性 (As) は 1.08 と高い対称性を示した。

内径 30 cm カラムでのセルファイン MAX S-h の充填事例

- カラム: 内径 30 cm (BPG 300)
- カラム高さ: 20 cm (Cf = 1.15)
- 充填バッファー: 純水 (25°C)
- 充填方法: 50%スラリー液を 0.25~0.30 MPa の圧力で充填
- 評価方法: 2 % アセトン (30 cm/hr) を通液

表 1 および図 2 に、異なるコンプレッションファクター (Cf) で充填した際の、カラム充填結果を示す。

表 1 異なる Cf 値でのカラム充填効率

Cf	N [m ⁻¹]	As	RPH
1.10	6,000	1.15	1.85
1.13	6,000	1.17	1.87
1.15	6,200	1.14	1.79
1.18	6,000	1.13	1.87

N : 理論段数、As : ピーク非対称性、RPH 還元理論段数

図 2 ピーク形状比較

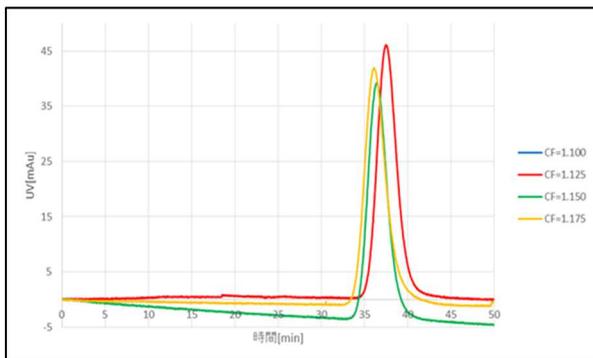
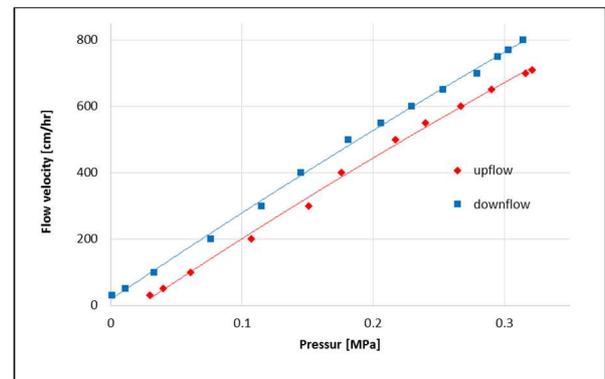


図 3 ではセルファイン MAX S-h の流速特性を示している。移動相はアップフロー（下部アダプターより通液）およびダウンフロー（上部アダプターより通液）で通液して比較した。

図 3 MAX S-h の圧力/流速カーブ



内径 30 cm カラムでのセルファイン MAX S-r の充填事例

- カラム：30 cm ID (BPG 300)
- カラム高さ：19.3 cm (Cf = 1.13)
- カラム充填バッファー：純水 (25°C)
- 充填方法：50%スラリー液を 0.25~0.30 MPa の圧力で充填
- 評価方法：2 % アセトン (30 cm/hr) を通液

図 4 ではセルファイン MAX S-r の内径 30 cm カラムでの充填効率の結果を示す。カラム充填時のコンプレッションファクターは Cf = 1.13 で充填した。

図4 MAX S-r のカラム充填効率

(A) カラム充填効率結果

N [m ⁻¹]	As	RPH
5700	1.13	1.95

(B) クロマトグラム

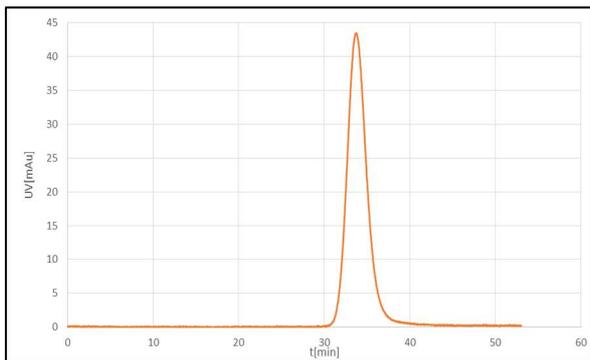
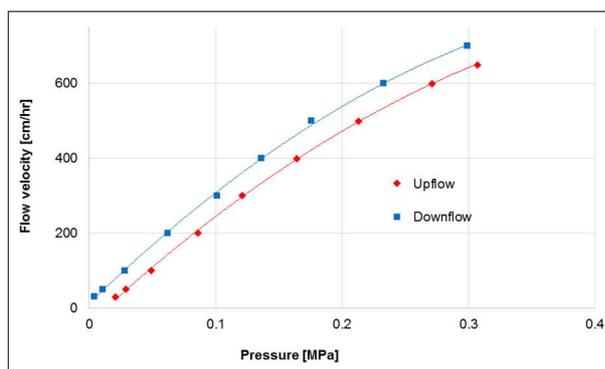


図5ではセルファイン MAX S-r の流速特性を示している。移動相はアップフローおよびダウンフローで通液して比較した。

図5 MAX S-r の圧力/流速カーブ



内径 30 cm カラムでのセルファイン MAX Q-h の充填事例

- カラム: 30 cm ID (BPG 300)
- カラム高さ: 20.4 cm (Cf = 1.13)
- カラム充填バッファー: 純水 (25°C)
- 充填方法: 50%スラリー液を 0.25~0.30 MPa の圧力で充填
- 評価方法: 2 % アセトン (30 cm/hr) を通液

表2ではセルファイン MAX Q-h の内径 30 cm カラムでの充填効率の結果を示す。カラム充填時のコンプレッションファクターは Cf = 1.13 で充填した。

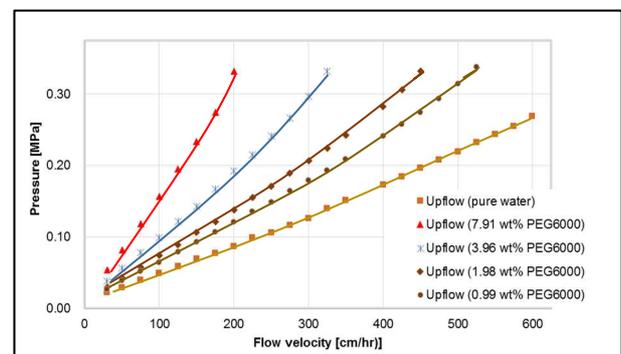
表2, MAX Q-h のカラム充填効率

N [m ⁻¹]	As	RPH
5200	1.07	2.14

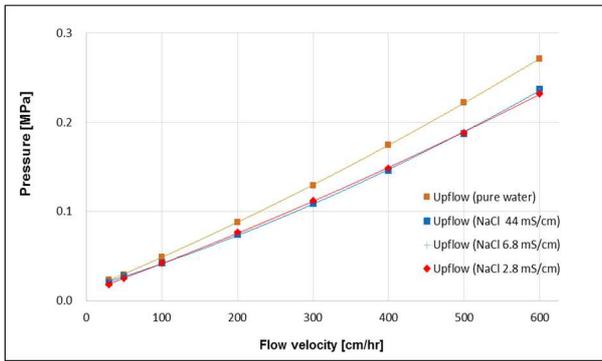
図6ではセルファイン MAX Q-h の流速特性を示している。移動相は様々な粘度の異なる移動相 (パネルA : PEG 6000、パネルB : NaCl) をアップフローで通液して評価した。

図6 粘度の異なる移動相での流速特性

(A) PEG6000 水溶液での流速特性



(B) NaCl 溶液での流速特性



セルファイン MAX Q-h をコンプレッションファクター1.13で内径30cmカラムに充填した。Asは1.07であった。44 mS/cm (0.5 M NaCl) の移動相を用いた場合、600 cm/hの流速を0.3 MPa以下の圧力で通液することができる。予想した通り、PEG 6000を加えたことでバッファの粘度は上昇した。それに伴って、圧力/流速カーブも変化して背圧が高くなった。最もPEG 6000の濃度が高い条件においては0.3MPa以内で175 cm/hを通液することができた。

内径 30 cm カラムでのセルファイン MAX Q-r の充填事例

- カラム: 30 cm ID (BPG 300)
- カラム高さ: 20 cm (Cf = 1.15)
- カラム充填バッファ: 純水 (25°C)
- 充填方法: 50%スラリー液を0.25~0.30 または0.35 MPaの圧力で60分間で充填した。このときのCf値は1.15であった。
- 評価方法: 2%アセトン (30 cm/hr)を通液

図7および表3ではセルファイン MAX Q-rの内径30 cmカラムでの充填効率の結果を示している。カラム充填時のコンプレッションファクターはCf = 1.13で充填した。

図7 溶出ピーク

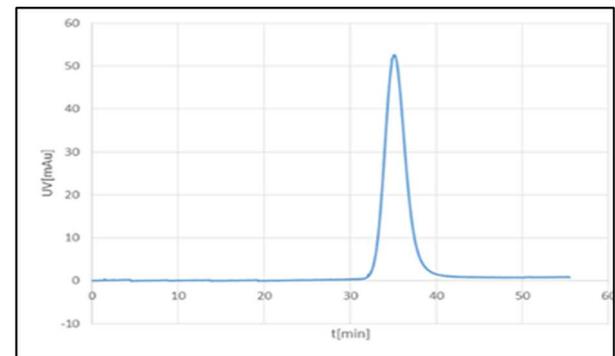
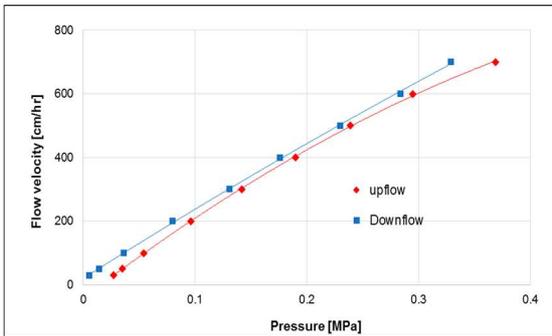


表3 カラム充填効率

充填圧力 [MPa]	Cf	N [m ⁻¹]	As	RPH
0.25	1.12	4,000	1.09	2.76
0.30	1.14	4,900	1.12	2.26
0.35	1.14	4,100	1.14	2.73

図8では30 cmカラムでのセルファイン MAX Q-rの流速特性を示している。カラムは0.35 MPaで60分通液して充填した。このときにCf値は1.15であった。

図 8 MAX Q-r の 30 cm カラムでの圧力/流速カーブ



内径 30 cm カラムでのセルフライン MAX DEAE の充填事例

- カラム: 30 cm ID (BPG 300)
- カラム高さ: 20 cm (Cf = 1.15)
- カラム充填バッファー: 純水 (25°C)
- 充填方法: 50%スラリー液を 0.15 MPa の圧力で 30 分間で充填した。Cf 値は 1.10、1.13、1.15、1.18 で評価した。
- 評価方法: 2 % アセトン (30 cm/hr) を通液

図 9 および表 4 ではセルフライン MAX DEAE の内径 30 cm カラムでの充填効率の結果を示している。カラム充填時のコンプレッションファクター Cf 値は 1.10、1.13、1.15、1.18 で充填した。

図 9, 様々な Cf 値での溶出ピーク

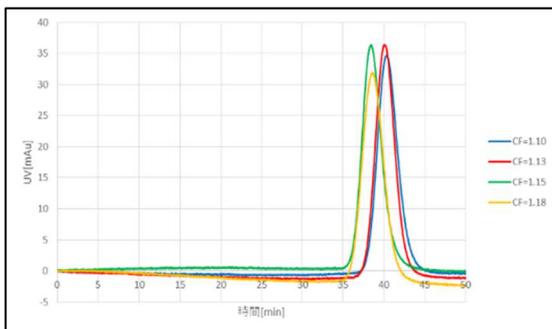


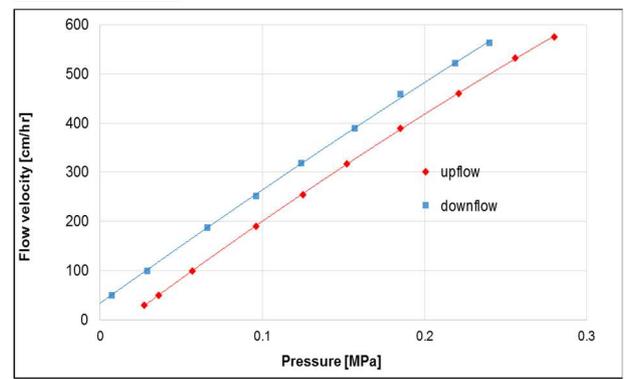
表 4 様々な Cf 値で充填した場合のカラム充填効率

充填圧力 [MPa]	充填時間 [min]	Cf	N [m ⁻¹]	As	RPH
0.15	30	1.10	5566.2	1.15	2.00
0.15	30	1.13	6135.8	1.09	1.81
0.15	30	1.15	5890.2	1.18	1.89
0.15	30	1.18	4727.2	1.08	2.35

粒径: 90 μm

図 10 では 30 cm カラムでのセルフライン MAX DEAE の流速特性を示している。カラムは 0.35 MPa で 60 分通液して充填した。このときに Cf 値は 1.15 であった。

図 10 MAX DEAE の 30 cm カラムでの圧力/流速カーブ



セルフライン MAX DEAE は Cf 値 1.10~1.18 の幅広い充填条件で充填することができた。

結論

このテクニカルノートではセルファイン MAX イオン交換クロマトグラフィー充填剤の充填方法に関して、評価している。カラム直径 30cm、高さ 20cm の大型カラムでの条件に関する評価を行ってきた。良好なピーク非対称性はコンプレッションファクター-Cf 値 1.09~1.15 の圧縮条件で達成できた。カラム直径 30cm の大型カラムを用いた場合、0.3 MPa 以内の圧力で 600 cm/h の流速を通液することができた。今回検討したすべての充填事例はパッキングバッファとして純水を用いた。従って特別なバッファを充填時に用いる必要はなく、充填の単純化が実現できた。このようにセルファイン MAX イオン交換クロマトグラフィー充填剤は物理的強度が高く、ラボカラムから産業用途の大型カラムまで簡単に充填できる特長を持つ。

ご注文の案内

製品名	容量	カタログ No.	製品名	容量	カタログ No.
セルファイン MAX S-r	1 mL x 5*	20300-51	セルファイン MAX Q-r	1 mL x 5*	20500-51
	5 mL x 1*	20300-55		5 mL x 1*	20500-66
	100 mL	20300		100 mL	20500
	500 mL	20301		500 mL	20501
	5 L	20302		5 L	20502
	10 L	20303		10 L	20503
セルファイン MAX S-h	1 mL x 5*	20400-51	セルファイン MAX Q-h	1 mL x 5*	20600-51
	5 mL x 1*	20400-55		5 mL x 1*	20600-55
	100 mL	20400		100 mL	20600
	500 mL	20401		500 mL	20601
	5 L	20402		5 L	20602
	10 L	20403		10 L	20603
セルファイン MAX CM	1 mL x 5*	20900-51	セルファイン MAX DEAE	1 mL x 5*	21000-51
	5 mL x 1*	20900-55		5 mL x 1*	21000-55
	100 mL	20900		100 mL	21000
	500 mL	20901		500 mL	21001
	5 L	20902		5 L	21002
	10 L	20903		10 L	21003

* ミニカラム

ご購入/技術サポート

(北米)

JNC America Incorporated
555 Theodore Fremd Avenue, Suite C-206
Rye, NY 10580 USA
TEL: 914-921-5400
FAX: 914-921-8822
E-mail: cellufine@jncamericany.com

(日本、アジア、その他)

JNC株式会社
ライフケミカル事業部
〒100-8105
東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビル9階
Tel: +81-3-3243-6150
Fax: +81-3-3243-6219
E-mail: cellufine@jnc-corp.co.jp

JNC 株式会社

ライフケミカル事業部

<http://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/>